

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 5 日 (05.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/011644 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 21/00, C12N 5/06, C07K 16/00

C12N 15/09,

(72) 発明者; および

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009563

(22) 国際出願日: 2003 年 7 月 28 日 (28.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-221232 2002 年 7 月 30 日 (30.07.2002) JP

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田 邦史 (OHTA, Kunihiro) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 瀬尾 秀宗 (SEO, Hidetaka) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 柴田 武彦 (SHIBATA, Takehiko) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 園田 吉隆, 外 (SONODA, Yoshitaka et al.); 〒163-0243 東京都 新宿区 西新宿 2 丁目 6 番 1 号 新宿 住友ビル 4 3 階 Tokyo (JP).

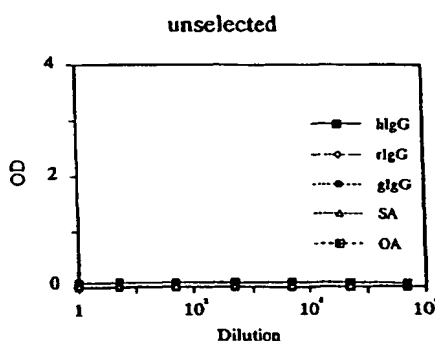
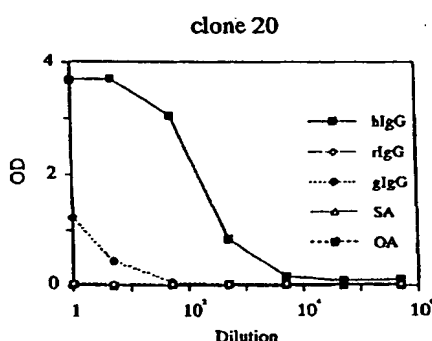
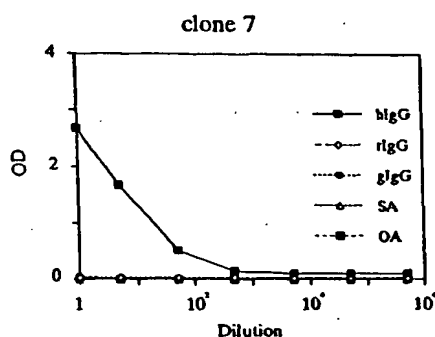
(81) 指定国 (国内): CN, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(続葉有)

(54) Title: METHOD OF PROMOTING HOMOLOGOUS RECOMBINATION OF SOMATIC CELLS AND METHOD OF CONSTRUCTING SPECIFIC ANTIBODY

(54) 発明の名称: 体細胞相同組換えの促進方法及び特異的抗体の作製方法



(57) Abstract: It is intended to provide a novel method whereby the homologous recombination of somatic cells at an antibody locus in immunocytes can be remarkably promoted to thereby establish the diversification of the antibody. Immunocytes (for example, DT40 cells) wherein the DNA homologous recombination occurs at an antibody locus are brought into contact with a histone acetylating enzyme inhibitor (for example, Trichostatin A) or the like so as to relax the chromatin structure at the antibody locus. Thus, the homologous recombination of somatic cells at the antibody locus can be promoted and diversified antibody molecules can be constructed. From the cells having the thus diversified antibody molecules through the promotion of the homologous recombination of somatic cells, an antibody specifically binding to an antigen can be constructed by an appropriate screening method (for example, using antigen-coated beads).

(57) 要約: 本発明は、免疫細胞中の抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを著しく促進させ、その結果、抗体の多様性を獲得するための新規方法を提供する。抗体遺伝子座においてDNA相同組換えが起きている免疫細胞 (例えば、DT40細胞等) をヒストンアセチル化酵素阻害剤等 (例えば、トリコスタチンAなど) と接触等させることにより、当該抗体遺伝子座におけるクロマチン構造を弛緩させることで、抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを促進し、多様な抗体分子の作製を可能にする。体細胞相同組換えの促進により抗体分子が多様化された細胞集団から、適切な選別方法 (例えば、抗原でコートしたビーズ等) を用いて抗原に対して特異的に結合する抗体の作製を可能にする。

WO 2004/011644 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

体細胞相同組換えの促進方法及び特異的抗体の作製方法

技術分野

本発明は、一般には体細胞相同組換えを促進する技術に係り、より詳細には体細胞中の遺伝子座における体細胞相同組換えを促進する方法及びかかる方法によって体細胞相同組換えが促進された免疫細胞に関する。

また、本発明は、前記の体細胞相同組換えの促進方法を利用して多様な抗体分子を作製する方法並びにかかる方法によって作成された多様な抗体にも関する。

さらに、本発明は体細胞相同組換えを促進するために使用して好適な薬剤にも関する。

背景技術

従来、体細胞相同組換えは、遺伝子の多様性を産み出す要因の一つであると考えられている。例えば、ニワトリ由来のB細胞培養株では、抗体遺伝子座においてDNA組換えが起きていることが知られている（Buerstedde et al. EMBO J. (1990) 9:921-927）。このようなDNA組換えを利用して種々のタンパク質因子を人工的に創り出すことが考えられるが、実際にはその組換え頻度は非常に低く、そのままではタンパク質因子の創製に利用することは困難であった。

また、抗体を作製する場合、通常ウサギやマウスなどの動物を利用するのが一般的であり、さらに多様な抗体を獲得することが望まれる場合には、多数の動物個体に対して抗原を免疫しなければならなかった。また、得られる抗体の力価も動物の個体差、抗原の性質に依存していたため、多様で高力価の抗体を安定して得ることは困

難であった。

そこで、前記ニワトリ由来のB細胞株等において生じているDNA相同組換えを利用して抗体を獲得することが考えられ、原理的にはこの手法により多様な抗体の合成が可能となると考えられる。しかし、上述の様に、DNA相同組換え頻度が極めて低いため、特定の抗原に対する抗体を培養細胞により人工的に作製することは現実的には極めて困難であると考えられていた。

一方、近年、XRCC2及びXRCC3のノックアウトDT40細胞株（ニワトリ由来のB細胞株）において、体細胞突然変異の頻度が増加するという報告がなされている（Sale et al. Nature (2001) 412:921-926）。このような体細胞突然変異を利用することも想定され、実際、Ramos細胞やXRCC2やXRCC3のノックアウトDT40細胞を用いることで抗体の抗原に対する結合を上昇させる試みがなされている。しかしながら、このような方法で得られた抗体に特異性はなく、様々なタンパク質に対して結合してしまう（Cumbers et al., Nat. Biotechnol. (2002) 20 (11):1129-1134）。体細胞突然変異は生体内においては親和性の成熟（affinity maturation）の為に二次的に利用されるものであることから、抗体の特異性を大規模に変えることは困難であると思われる。

発明の開示

本発明者らは、上記事情に鑑みて、所望の体細胞相同組換えを制御された状況下で誘起促進させる方法がないかについて鋭意研究した結果、意外にも、免疫細胞の染色体のクロマチン構造を弛緩させることで、体細胞相同組換えの頻度を大幅に高めることが可能になることを見出した。

よって、本発明は、一般には、体細胞中の遺伝子座における体細胞相同組換えを促進する方法を提供することを目的とする。

また、本発明は上記方法によって体細胞相同組換えが促進された

免疫細胞を提供することを目的とする。

さらに、本発明は、免疫細胞において生じている体細胞相同組換えを利用して多様な抗体を獲得することを可能にする抗体作製方法を提供することを目的とする。

またさらに、本発明は上記抗体作製方法により作製された多様な抗体を提供することを目的とする。

加えて、本発明は体細胞相同組換えを促進するために使用して好適な薬剤を提供することを目的とする。

しかして、本発明においては、遺伝子座においてDNA相同組換えが起きている体細胞の相同組換えを、該体細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させることによって促進することを特徴とする体細胞相同組換えの促進方法が提供される。また、かかる方法によって体細胞相同組換えが促進された免疫細胞も提供される。

また、本発明においては、抗体遺伝子座においてDNA相同組換えが起きている免疫細胞から抗体を作製するに当たり、該免疫細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させることによって、抗体遺伝子座におけるDNA相同組換えを促進させ、それによって多様な抗体を獲得することを特徴とする抗体作製方法が提供される。また、かかる方法によって作成された多様な抗体も提供される。

抗体遺伝子の多様性の獲得という観点では、相同組換えは、突然変異よりも高効率であることが知られており、XRCC2/ XRCC3の変異株(Sale et al., Nature (2001) 412:921-926)と比べると、より容易に抗体の高い多様性を獲得し得ると考えられる。抗体遺伝子座における体細胞相同組換えが促進された細胞であって、目的の抗体を産生する細胞が得られれば、当該細胞を培養し、維持していくことで、目的の抗体をいつでも簡便に調製することが可能となる。従って、将来的には実験動物を使わずに、あらゆる抗原に対して高力価な抗体を作製する技術の確立が期待でき、病気等の治療に役立つ抗体等を高力価で継続的に提供することが可能となる。また、動

物愛護の観点からも利用価値があると思われる。

本発明は、従来技術の動物を使った抗体作製に比べ、はるかに少ない量（ $1\mu\text{g}$ 以下。動物には通常 mg レベルを免疫する）の抗原で抗体を作製することができ、作製時間の大幅な短縮も可能である（最短で1週間。動物ではポリクローン抗体で数週間、モノクローン抗体で数ヶ月を要する）。さらに、作製期間の短縮による人件費の圧縮から、モノクローナル抗体におけるハイブリドーマ作製に要するコストを大幅に下げることが可能である。また、培養細胞を用いた系であるため、個体レベルで有害な因子であっても、細胞レベルで無害であるならば、抗原として使用し得る点に利点を有する。

また、試験管内で抗体を作製する手法として、従来はファージディスプレイ法などが知られているが、これらの手法は、抗体軽鎖、重鎖の可変領域遺伝子をリンカーでつなぎ、一本鎖にしたものをファージミドに組み込んだライブラリーを用いる。本来の抗体とは、可変領域以外、極めて異なる構造を有するものであるため、実際に抗体にするためには、選別したファージから遺伝子を再クローニングし、抗体の定常領域とつなげる必要がある。一方、本発明に係る方法によると、すでにIgMの形になっていることから、すぐに抗体分子の形態で使用可能な状態にある。その後の操作は周知の方法に従うことが可能であり、例えば、既存の二次抗体などを利用することで単離、精製等を行うことができる。

さらに、通常の *in vitro*（ファージディスプレイ法など）の手法は初期の段階で作製したライブラリーの質（例えば、クローン数など）が重要であり、ライブラリー作製に多大な手間がかかる。このことに加えライブラリーは一般に、繰り返し使用すると性能が低下することから、その維持も容易ではない。

本発明に係る方法によれば、単純な培養操作でライブラリーの作製が可能であり、作製されたライブラリー自体が自ら多様化していくことから、通常の培養細胞として維持管理する事ができる。また、

ファージディスプレイ法では数回のスクリーニングが必要となる場合も多いが、本発明に係る方法によれば、1回のスクリーニングで特異的抗体を得ることができ、容易かつ迅速に、特異的抗体を得ることができる。

本発明において使用できる免疫細胞としては、抗体遺伝子座において体細胞相同組換えが生じる細胞であれば如何なるものでも使用可能であると思われるが、好適にはニワトリ由来のB細胞株であるDT40細胞が使用される。

クロマチン構造を弛緩させるための手段は、当業者において周知である如何なる手段でも可能であると思われるが、好ましくはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を対象の細胞に接触させる処理を用いることができる。かかる阻害剤はヒストン脱アセチル化酵素を阻害すれば如何なるものでもよいが、好ましくはトリコスタチンAが利用される。

また、クロマチン構造を弛緩させる方法としてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に免疫細胞を接触させる場合、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤での処理濃度及び処理時間は、接触させる細胞が死に至らない範囲内であれば、使用可能である。具体的には、トリコスタチンAの場合には、処理濃度は約0.5ng/mlから約5.0ng/mlが好ましく、処理時間としては約2週間から約2年間が好ましい。

またさらに、本発明においては、遺伝子座における体細胞相同組換えを促進するための薬剤であって、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤からなる薬剤が提供される。

本発明における薬剤としては、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であれば如何なるものでも使用可能であるが、トリコスタチンAが最も一般的でかつ好適である。

図面の簡単な説明

図1は、定常領域及びサザンハイブリダイゼーションのプロープ

領域欠失変異株作製のための模式図を示す。プラストサイシン耐性遺伝子が挿入されたプラスミド（コンストラクト UR1）を用いて、非再編成軽鎖遺伝子座の定常領域付近（プローブ領域を含む）をプラストサイシン耐性遺伝子で置換させている。

図 2 は、抗体軽鎖遺伝子クロマチン構造の TSA 依存的なアクセシビリティの増加を示す。naked DNA とは、除タンパクした同じ領域の DNA のことである。

図 3 は、トリコスタチン A の相同組換えへの影響を示す。

(a) トリコスタチン A 1.25 ng/ml 存在下で 3 週間培養したクローンの抗体軽鎖遺伝子可変領域の多様性を示す。

(b) トリコスタチン A 非存在下で 3 週間培養したクローン (No.1-No.6) の抗体軽鎖遺伝子可変領域の多様性を示す。

図 4 は、トリコスタチン A の IgM (+) 細胞出現頻度への影響を示す。

(a) トリコスタチン A 1.25 ng/ml 存在下で培養した 5 クローン (No.1-No.5) の結果を示す。

(b) トリコスタチン A 非存在下で培養した 6 クローン (No.1-No.6) の結果を示す。

図 5 は、ヤギ IgG 磁気ビーズにセレクションを行った細胞の抗原特異性を示す。

(a) ヤギ IgG 磁気ビーズでセレクションを行った後の細胞のヤギ IgG への結合性を示す。左：セレクションを行わなかった細胞集団の、ヤギ IgG FITC に対する結合性の結果を示す

(unselected)。中央：ヤギ IgG と強い結合を示すクローンの結果を示す (clone No.3)。右：ヤギ IgG と極めて弱い結合性しか示さないクローンの結果を示す (代表例のみ、clone No.17)。

(b) ヤギ IgG に対して強い結合を示すクローン (No.3) の他の抗原への結合性の結果を示す。上段：ストレプトアビジンに対する結合性の結果を示す (SA)。左がセレクションを行わなかった細胞集

団(SA、unselected)、右がヤギ IgG に対して結合するクローン(SA、clone No.3)の結果を示す。下段：オボアルブミン-FITC に対する結合性の結果を示す(OA)。左がセレクションを行わなかった細胞集団(OA、unselected)、右がヤギ IgG に対して結合するクローン(SA、clone No.3)の結果を示す。

図 6 は、ヒト IgG 磁気ビーズによりセレクションを行った細胞の解析結果を示す。

(a) エライザ法において強いシグナルの見られた細胞の、ヒト IgG FITC に対する結合性の結果。代表的な 3 クローン (clone7、clone8、clone20) の結果を示す。

(b) (a) で示した 3 クローンに関し、結合の特異性を検討した結果を示す。ヒト IgG FITC (hIgG)、ウサギ IgG FITC (rIgG)、ヤギ IgG FITC (gIgG)、ストレプトアビジン FITC (SA)、オボアルブミン FITC (OA) で染色し、FACS で解析した結果を示す。unstained は、染色していないもののことである。

(c) 細胞培養上清でエライザ法を行った結果である。clone7、clone20、セレクションを行っていない細胞 (unselected) について、ヒト IgG (hIgG)、ウサギ IgG (rIgG)、ヤギ IgG (gIgG)、ストレプトアビジン (SA)、オボアルブミン (OA) でコートしたイムノプレートを用い、エライザ法を行った。培養上清は、1 倍希釈から 50 万倍希釈までの希釈系列 (Dilution) をとった。

発明を実施するための最良の形態

本発明の抗体作製方法は体細胞相同組換えの促進方法を一部に利用するものであるので、以下では抗体の作製方法について詳細に説明する。

前述のように、本発明の抗体作製方法においては、抗体遺伝子座

において DNA 相同組換えが起きている免疫細胞を選択して培養し、抗体を作製するにあたり、該免疫細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させる操作を行うことによって、抗体遺伝子座において起きている DNA 相同組換えの頻度を大幅に向上させ、それによって多様な抗体を獲得する。

よって、以下では、細胞培養、クロマチン構造の弛緩の誘導、クロマチン構造の弛緩の確認、相同組換えの確認、抗体の発現の確認について順に説明する。

細胞培養：

本発明における「免疫細胞」とは、抗体産生能を有する B 細胞を指し、宿主動物の種類としては、マウス、ヒツジ、ラット、ニワトリなどが含まれる (Honjo, T., Alt, F.W. (1995). Immunoglobulin Genes, 2nd Edition (Academic Press))。好ましくは、株化された細胞が使用され、特に好ましくは免疫細胞としては DT40 細胞が使用される。

「DT40 細胞」とは、ニワトリ由来 B 細胞の株化培養細胞であり、当該細胞の保有する染色体に何らかの修飾（例えば、特定の遺伝子の組換え、挿入、削除等）を加えられた、誘導体株、サブライン (Subline) も含む。

本発明で用いる細胞の培養条件は当該技術分野において周知の方法によって行われるが、選択される免疫細胞に適した培地、培養条件（培養温度、CO₂濃度）下で行われることは言うまでもない。しかして、選択される免疫細胞が DT40 細胞である場合、例えば、培地は IMDM (Invitrogen 社) を用い、培養温度は例えば 39.5℃、5% の CO₂ 濃度条件下で行う。培養は、細胞濃度を一定に保ちながら行い、適当な期間毎（例えば、日毎、週毎）に目的の細胞の抗体遺伝子座における体細胞相同組換えの有無を確認する。

免疫細胞の抗体遺伝子座におけるクロマチン構造の弛緩の誘導：

ここで用いられる「クロマチン構造の弛緩」とは、標的の遺伝子

座（ここでは、抗体遺伝子座）に、相同組換えに関与する各種因子が直接或いは間接的に作用し得るように、当該遺伝子座全体のクロマチン構造を緩めることをいう。「弛緩」を引き起こす因子には、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、クロマチン構造変換因子（例えば、Swi/Snfタンパク質、Iswiタンパク質、及びこれらのホモログ、及びこれらの機能複合体）などが含まれる。好ましい「弛緩」を引き起こす因子は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である。

「ヒストン脱アセチル化阻害剤」には、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の活性を抑制する活性を持つ抗体などのタンパク質因子、トリコスタチンA、ブチル酸及びバルプロ酸など小分子化合物など、当業者に知られているものであれば如何なるものも使用可能であると思われるが、最も好適にはトリコスタチンAが使用される。

免疫細胞の抗体遺伝子座におけるクロマチン構造を弛緩させるために、弛緩を誘導する因子を、目的の免疫細胞中で発現させ又は該細胞と直接接触させる。弛緩を誘導する因子がタンパク質性の因子であって、細胞内で該因子を発現させてクロマチン構造の弛緩を誘起する場合、目的の細胞における該因子の発現にとって適切なプロモータ、ターミネータ、エンハンサー等を保持するベクターを目的の細胞に形質移入することにより達成される。該因子の免疫細胞内での発現は当業者にとって周知の方法によって容易に実施することが可能である（Spector, D.L., et al. (1998). *Cells a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press) を参照のこと）。弛緩を誘導する因子を目的の免疫細胞に直接接触させる場合は、該因子の濃度を一定に保ちながら培養する。弛緩を誘導する因子を発現させ又は接触させた細胞は、抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを引き起こすために適切な時間、培養する。例えば、該因子がヒストンアセチル化酵素阻害剤のトリコスタチンAである場合、抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを引き起こすために

適切な時間は、好ましくは、約 2 週間から約 2 年間、より好ましくは約 2 週間から約 6 週間であり、最も好ましくは約 5 週間であり、適切な濃度は、好ましくは、約 0.5 ng/ml から約 5.0 ng/ml であり、最も好ましくは、1.25 ng/ml である。

抗体遺伝子座におけるクロマチン構造変化の検出：

特定の遺伝子座領域におけるクロマチン構造の変化は、当該領域に対する DNase 感受性を指標として検出するのが一般的である。上述した方法による処理を行った細胞において、目的の遺伝子座領域のクロマチン構造が弛緩すると、その部分における DNA 及びクロマチン構成タンパク質（ヒストン等）間の結合に緩みが生じると考えられる。その結果、クロマチン構成タンパク質と結合していたために DNase により切断されなかった DNA 部分が、クロマチン構造の弛緩により緩むことで、DNase に対して感受性を示すようになる。クロマチン構造の変化の前後における、DNase に対する感受性の変化は、当該領域の DNA 切断パターンを変化させることとなり、新たに生じた DNA 断片をサザンブロット法等で検出することで、クロマチン構造が弛緩した遺伝子座領域を確認することができる。ここで、DNase としては、DNase I、MNase（球菌ヌクレアーゼ）などが一般的に用いられる。

抗体遺伝子座における体細胞相同組換えの確認：

体細胞相同組換えの確認は、上述した方法による処理を行った細胞の抗体遺伝子座領域のゲノム配列を決定し、上述の処理を行っていないコントロールの細胞の抗体遺伝子座領域のゲノム配列と比較することで行う。抗体遺伝子座領域のゲノム配列の決定方法として、一般的には、該遺伝子領域を特異的な DNA プライマーにより増幅し、増幅された DNA 断片を適当な配列決定用のベクターに組込んで配列決定を行う。簡単には、目的の免疫細胞から調製したゲノム DNA の抗体遺伝子座領域を増幅するのに必要な DNA プライマー（例えば、目的の抗体遺伝子領域全体を含むように、該遺伝子の

5'側近傍に正方向のプライマーを設計し、該遺伝子の3'側に逆方向のプライマーを設計する)を用意し、抗体遺伝子座領域をPCR法により増幅させる。増幅させる抗体遺伝子座領域は、抗体軽鎖遺伝子又は/及び抗体重鎖遺伝子のどちらかであり、好ましくは、何れかの遺伝子の可変領域がよい。増幅に使用されるDNAポリメラーゼは市販のものを用いることができるが、長いDNA鎖の伸長が可能で、かつ正確性の高いものを使用することが望ましい。抗体遺伝子座領域の増幅を行うための条件は、使用するDNAプライマーのアニール温度、使用するDNAポリメラーゼの性質等に依存するが、例えば、98℃ 2分間の反応後、98℃ 30秒、57℃ 30秒、72℃ 1分を27サイクル、さらに72℃で15分間反応させる。反応後の増幅産物は、アガロースゲル電気泳動で分離し、目的抗体遺伝子座領域を含むDNAのバンドを切り出し、DNAを回収後、配列決定用のベクターへ組込む。配列決定用のベクターは当該技術分野で用いられる如何なるベクターであってもよいが、例えば、pCR2.1-TOPO (Invitrogen社)などが用いられる。上記調製された配列決定用のベクター中の、抗体遺伝子座領域のDNA配列を解析し、抗体遺伝子座における体細胞相同組換えを誘導していない細胞由来の対応配列と比較して、体細胞組換えの程度を測定する。

抗体の発現の確認：

上述の記載に従い抗体遺伝子座における体細胞相同組換えが確認された細胞について、実際に抗体の発現が誘導されていることを確認する。

「多様な抗体」には、IgA、IgD、IgE、IgG、IgY及びIgMが含まれる。

(i) 分泌された抗体の確認

体細胞相同組換えが行われた遺伝子座に由来する抗体が分泌型の場合、産生された抗体分子を含む培養上清について目的の抗体分子の存在を確認する。確認の方法としては、当業者にとって周知の如

何なる方法によっても実施することが可能であるが、例えば、產生された抗体分子を特異的に認識する抗体による検出法（例えば、標識化した二次抗体を用いる、ウェスタンブロット法、エライザ法など）が一般的である。簡単には、培養上清をそのまま、ウェスタンブロット法、又はエライザ法等に用いることができる。產生された抗体の濃度が低い場合には、該培養上清から目的の抗体を濃縮した後、產生された抗体の確認を行うことができる。簡単には、該培養上清から硫酸沈殿法（50%硫酸）等により抗体分子を濃縮沈殿させ後、抗体分子のペレットを適当なバッファー（例えば、PBSなど）に懸濁後、同バッファーに対して透析する。透析は透析外液を数時間毎に代えながら、硫酸が除かれるまで行う。得られた抗体分子に対して、当該抗体分子を特異的に認識する抗体を用い、ウェスタンブロット法により直接又は間接的に產生抗体分子の検出を行う。あるいは、產生される抗体がIgGである場合には、プロテインA又はプロテインGを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより直接精製することで確認してもよい。

(ii) 細胞膜上に発現されたIgMの確認

体細胞相同組換えの促進により產生された抗体が、細胞膜上に提示されるIgMの場合、抗IgM抗体を用いた蛍光活性化セルソーター（FACS）分析によって確認することができる。

以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1：トリコスタチンA（TSA）処理後のDT40細胞の抗体遺伝子座領域におけクロマチン構造の解析

TSAにより実際に抗体軽鎖遺伝子のクロマチン構造に変化が生じているかどうかは、球菌ヌクレアーゼ（MNase）感受性を指標とし、間接末端標識法を用いて解析した。ニワトリ抗体遺伝子にはVJ組換えを起こしたものと起こしていないものが存在するが、実際に抗体產生において機能しているのはVJ組換えを起こした側のみ

である事が知られている。しかしながら両者の配列は、ほぼ同一であることから、間接末端標識法をそのまま適用するだけでは、野生型 DT40 細胞の、VJ 組換えを起こした遺伝子座のみを解析することは困難である。この問題を解決するために、VJ 組換えを起こしていない側において、サザンハイブリダイゼーションのプロープとして用いる領域の周辺配列を欠失した変異株を作製し、この変異株を用いて MNase 感受性の解析を行った。

欠失変異株の作製：

抗体軽鎖遺伝子をクローニングしたプラスミド #18-4 (京都大学医学系研究科、武田俊一教授より譲渡されたもの) を EcoRI で消化し、二つ生じる断片のうち、大きい方とプラストサイシン耐性遺伝子 (武田教授より譲渡されたもの) 断片をライゲートし、大腸菌にトランスフォームした。これにより、定常領域及びサザンハイブリダイゼーションのプロープとして用いる領域を含む領域が欠失し、それに代わりプラストサイシン耐性遺伝子が挿入されたプラスミド (UR1) が得られた (図 1)。このプラスミド約 20 µg を XbaI で消化して直線化し、既知の手法 (Buerstedde, J.M., Takeda, S. Cell. 1991 67(1):179-88.) に従って DT40 細胞に感染させ、欠失変異をもつ DT40 細胞株 (3H12) を作製した。

核の単離：

TSA (0 ng/ml, 0.625 ng/ml, 1.25 ng/ml, 2.5 ng/ml) を加えた培地で 8 時間培養した 10^7 - 10^8 の 3H12 細胞含む培養液を 300 g, 15 分遠心し、細胞を回収したのち、10 ml の PBS に懸濁し、再び 300 g で 15 分遠心してペレットに回収した。その後、細胞を 4ml の Nuclear Buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0); 0.32 M Sucrose, 5 mM MgCl₂, 1 % TritonX-100, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF) に懸濁後、氷上で 15 分間放置して細胞膜を除去した。1000 g で 5 分間遠心することで核を回収した。

MNase 消化：

核のペレットを RSB(10 mM Tris- HCl (pH7.5), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF) 10 ml に再懸濁した。再び 1000 g で 5 分間遠心して核を回収し、400 .l の RSB に懸濁した。この核懸濁液の DNA 濃度を Hoechst 33258 の結合で測定し、100 .g 相当の懸濁液を RSB で 500 .l にした。これを各細胞ごとに 4 本ずつ用意した。0.5 .l の 1 M CaCl₂、さらに MNase(0 U, 0.04 U, 0.2 U, 1 U) を加え、37 °C で 5 分間消化後、20 .l の 0.5 M EDTA と 12.5 .l の 20 % SDS、2 .l の 15 mg/ml プロテイナーズ K を加え、50 °C で一晩反応させた。500 .l のフェノールクロロホルムを添加し、30 分間、穏やかに震盪させた後、1.5 Krpm で 5 分間遠心し、上層を回収し、新しいチューブに移した。クロロホルム 500 .l をさらに加えて再び 30 分間、震盪させ、1.5 Krpm で 5 分間遠心したのち、上層を新しいチューブに移した。50 .l の 3 M 酢酸ナトリウム、1 ml の冷エタノールを加え、穏やかに混ぜた。1.5 Krpm で 20 分間遠心し、上清を除去後、80 % エタノールを 500 .l 加えて穏やかに混ぜ、再び 1.5 Krpm で 5 分間遠心した。上清を除去し、沈澱を風乾させた。ここに 100 .l の TE (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA) を加え、55 °C で 1 時間保温し、その後 4 °C で一晩放置して溶解させた。

サザンブロット解析：

サザンブロット解析は、Church 及び Gilbert (Church, G.M., Gilbert, W. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1984 81(7):1991-5.) の方法で行った。20 .g 相当の DNA をスピンカラム (ファルマシア社 ProbeQuant G-50) で精製した後、制限酵素 BsaAI (NEB 社) で消化した。その後フェノールクロロホルム抽出を行い、エタノール沈澱で DNA を回収したのち、TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) バッファー中、1.5 % アガロースゲルで電気泳動を行った。DNA は Vacu Gene XL nucleic blotting system

(Pharmacia) によりメンブレンにトランスファーした。最初に変成バッファー (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) で 15 分間変成させ、次にトランスファーバッファー (1.5 M NaCl, 0.25 M NaOH) で 4 時間かけてトランスファーした。メンブレンは 20 x SSC で中和した後、ハイブリダイゼーションバッファー (10 mg/ml BSA, 0.5 M Na₂PO₄ (pH7.4), 7 % SDS, 1 mM EDTA) で 62 °C、1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、[³²P]dCTP でラベルしたプローブ 50 ng をハイブリダイゼーションバッファーで 62 °C、一晚、ハイブリダイズさせた。その後、メンブレンを 65 °C に加温した Wash Buffer (20 mM Na₂PO₄ (pH7.4), 1 % SDS, 1 mM EDTA) 50 ml で 62 °C、10 分間洗浄し、これをさらに 4 回繰り返して洗浄した後、メンブレンの放射活性を BAS2000 で解析した。なお、プローブ DNA は、PCR 法 (ロッシュ社、Expand Hi Fidelity PCR system) を用いて作製した。その際プライマーは、ATCTTGCCCTTCCTCATGGC (配列番号 1) および、GTTTGGGTGAACGTGGTTC (配列番号 2) を使用し、鋳型はニワトリ抗体軽鎖遺伝子をクローニングしたプラスミド #18-4 を鋳型とした。

結果：

各濃度の TSA 存在下において (0 ng/ml, 0.625 ng/ml, 1.25 ng/ml, 2.5 ng/ml)、添加する MNase (0 U, 0.04 U, 0.2 U, 1 U) 量を増加させたところ、TSA 濃度及び MNase 量の増加に伴い、VJ 領域が切断されて生じる DNA 断片が出現することが確認された (図 2、「VJ」で示した位置のバンド、例えば、左から第 5 レーン目と第 17 レーン目を比較する)。これらのバンドは、TSA 非存在下 (0 ng/ml) において MNase 量を増加させても検出されなかったため (図 2、左から第 5 レーン目)、VJ 領域が MNase により切断されるためには、TSA の存在が必要であることを示す。以上の結果から、TSA により DT40 細胞株の VJ 領域 (抗体軽鎖

遺伝子座領域)のクロマチン構造が弛緩し、この領域への MNase のアクセシビリティが増加したことが確認された。

実施例 2 : トリコスタチン A (TSA) による DT40 細胞中の抗体遺伝子座における体細胞相同組換え促進の確認

細胞培養 :

DT40 細胞は、CO₂ 恒温槽にて 5 % の CO₂、39.5 °C で培養した。培地は、IMDM 培地 (Invitrogen 社) を用い、10 % FBS、1 % ニワトリ血清、ペニシリン 100 単位/ml、ストレプトマイシン 100 . g/ml、2-メルカプトエタノール 55 . M を加えて使用した。また、トリコスタチン A (和光純薬) は、メタノールに 5 mg/ml に溶解したものをストックとし、最終濃度が 1.25 ng/ml となるように適宜培地で希釈して用いた。

細胞表面に Ig M を発現していない DT40 細胞 (以下、Ig M (一)細胞) を、約 20 細胞/ml に希釈して 96 穴プレートに 100 . l ずつ分注した。この際、培地にトリコスタチン A を 1.25 ng/ml 加えたものと、加えないものを用意した。シングルコロニーが現れるまで培養し、5 クローン (TSA なしは 6 クローン) を新鮮な培地 2 ml を入れた 6 穴プレートに移した。なお、この際 TSA 濃度は当初の濃度を維持し、細胞濃度は 10⁵ ~ 10⁶ 個/ml に保ちながら培養を続けた。

ゲノム DNA の抽出 :

上述の方法により 3 週間培養した DT40 細胞の生細胞を蛍光活性化セルソーターで回収した。EPICS ELITE ESP により、生細胞 10 万個を 1.5 ml チューブに集めた。シース液に懸濁された細胞を遠心 (1000 g, 10 min) により回収し、ペレットに直接 300 . l のゲノム抽出バッファー (100 mM Tris-HCl, pH8.0, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl 及び 100 . g/ml プロテイナーース K) を加え、50 °C で一晩消化した。翌日、750 . l のエタノールを加

え、穏やかに上下に反転させて混ぜた。ゲノム DNA を遠心 (1000 g, 10 min) により回収し、70 %エタノールで洗い、風乾した。ここに 100 . l の TE バッファー (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA) を加え、50 °C で 30 分放置した後、4 °C にて一晩かけて溶解させた。

抗体軽鎖遺伝子可変領域の配列の解析：

抗体軽鎖遺伝子可変領域の増幅には、PCR (Perkin Elmer 9600) を利用した。ゲノム DNA 溶液 5 . l (細胞 5000 個相当) を鋳型とし、プライマーは、上流 (CACACCTCAGGTACTCGTTGCG (配列番号 3))、下流 (TCAGCGACTCACCTAGGACGG (配列番号 4)) それぞれ 10 pmol を使用した。Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を用いて、50 . l スケールで反応させた。反応条件は、98 °C 2 分の後、98 °C 30 秒、57 °C 30 秒、72 °C 1 分を 27 サイクル行い、最後に 72 °C 5 分反応させた。その後、ExTaq DNA Polymerase (宝酒造) を 1 . l 加え、72 °C 15 分反応させた後、全反応液の 20 . l 分をアガロースゲル電気泳動で分離した。軽鎖遺伝子可変領域に相当するバンドを切り出し、Gel Extraction kit (Qiagen 社) により DNA を回収後、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen 社) にて pCR2.1-TOPO ベクターに組み込み、大腸菌にトランスフォーメーションした。プラスミドを抽出し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer 社) により配列を解析した。

結果：

増幅された抗体軽鎖遺伝子可変領域を、プラスミドベクターにクローニングしたものの配列をしらべてみたところ、図 3 の結果が得られた。トリコスタチン A を加えて培養した細胞では、42 サンプルが 16 種類に分類された (図 3 (a))。この多様性は、相同組換え、遺伝子挿入、遺伝子欠失、点変異により生じたものであることが分かった。一方、トリコスタチン A 非存在下で培養した細胞では、

30 サンプル調べたかぎりでは、相同組換えは見い出されなかった（図3(b)）。以上の解析結果より、トリコスタチンAの添加により、DT40細胞株での抗体軽鎖遺伝子の多様性が著しく上昇したと結論付けられる。

実施例3：トリコスタチンAにIgM(+)DT40細胞の出現頻度の促進

蛍光活性化セルソーター（FACS）によるIgMの発現の確認：

実施例2に記述した方法でトリコスタチンA処理を行ったIgM(-)細胞の約 10^6 個を含む培養液を1.5 mlチューブにとり、遠心により該細胞を回収（1000 g、5分）し、染色バッファー（PBS、0.3 % BSA）200 . lに懸濁した。細胞を再び遠心により回収し、次にFITCラベルした抗ニワトリIgM抗体（BETHYL社）を染色バッファーで1/250倍希釈したものを200 . lで懸濁し、氷上で1時間反応させた。細胞を遠心により回収し再び染色バッファー200 . lに懸濁し、これを遠心することで細胞の洗いを行った。この洗いのステップをもう一度繰り返したのち、細胞を5 . g/mlのヨウ化プロビジウム（ナカライ社）を含む染色バッファー1100 . lに懸濁した。IgMを発現している細胞の割合は、EPICS ELITE ESP（Beckman Coulter社）により、10000細胞を測定して算出した。その際、ヨウ化プロビジウムにより染色される細胞は死細胞としてゲートアウトした。

結果：

一週間おきにFACSでIgMを発現している細胞（以下、IgM(+)細胞）の割合を測定したところ、図4のように、時間依存的にIgM(+)の割合が増加するものが見られた。IgM(+)細胞は、IgM(-)細胞が相同組換えを起こした結果生じたと考えられる。

実施例4：抗原特異的抗体の選択

抗原磁気ビーズの作製：

磁気ビーズは Dynabeads M-280 Tosylactivated (Dynal 社) を用い、抗原との共役は解説書に従った。この際、磁気スタンドは Dynal MPC (Dynal 社) を用いた。ビーズ $200\mu\text{l}$ を $500\mu\text{l}$ の BufferA (0.1M Na-Phosphate pH7.4) で 3 回洗った後、BufferA $400\mu\text{l}$ 中で $240\mu\text{g}$ のヤギ IgG (SIGMA 社) またはヒト IgG (SIGMA 社) と 37°C で 24 時間、回転により攪拌しながら反応させた。次にビーズを BufferC (10mM Na-Phosphate pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% BSA) $500\mu\text{l}$ で 2 回洗浄した。その後 BufferD (0.2M Tris-HCl pH8.5, 0.1% BSA) $500\mu\text{l}$ を加え、 37°C で 4 時間、回転により攪拌しながら反応させ、ブロッキングを行った。その後 $500\mu\text{l}$ の BufferC で 2 回洗浄した後、0.02% アジ化ナトリウムを含む BufferC $400\mu\text{l}$ に懸濁した。

抗原磁気ビーズによるセレクション：

抗原磁気ビーズによるセレクションは、Cumbers らの方法 (Cumbers et al., Nat. Biotechnol. (2002) 20 (11):1129-1134) に準じた。トリコスタチン A 1.25 ng/ml を含む IMDM 培地で 6 週間以上植え継いだ野生型 DT40 細胞約 5×10^7 個をセレクションバッファー (1% BSA を含む PBS) 5 ml により 2 回洗浄し、さらに 1 ml のセレクションバッファーで洗浄した。その後細胞を 1 ml のセレクションバッファーに懸濁したのち、 $1\mu\text{l}$ 相当の抗原磁気ビーズ (セレクションバッファー 1 ml で 2 回洗浄したもの) に加えた。 4°C で 10 分間、回転により攪拌しながら反応させた。以後の処理は、用いた抗原の種類によって若干の変更を加えているため、分割して記述する。

(i) ヤギ IgG 磁気ビーズによるセレクション

ヤギ IgG 磁気ビーズでセレクションを行った細胞に関しては、磁気スタンドを用いて 1 ml のセレクションバッファーで 3 回洗浄し

た。その後回収した細胞を $500\mu\text{l}$ のセレクションバッファーに懸濁したのち、IMDM 培地 10ml に加え、これを 96 穴プレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注した。96 穴プレートは CO_2 インキュベーター中で 40°C で保温した。

(ii) ヒト IgG 磁気ビーズによるセレクション

ヒト IgG 磁気ビーズによるセレクションを行った細胞に関しては、磁気スタンドを用い、2.5% の Pluronic F68 (SIGMA 社) を含む 1ml のセレクションバッファーで 3 回洗浄した。その後回収した細胞を $500\mu\text{l}$ のセレクションバッファーに懸濁したのち、IMDM 培地 30ml に加え、これを 96 穴プレートに $300\mu\text{l}$ ずつ分注した。96 穴プレートは CO_2 インキュベーター中で 40°C で保温した。

蛍光標識抗原による染色：

96 穴プレートの 1 個のウェルに由来する細胞約 10^6 個を含む培養液を 1.5ml チューブにとり、遠心により細胞を回収し、セレクションバッファー $200\mu\text{l}$ で 2 回洗浄した。次に FITC ラベルした抗原（ヤギ IgG、ヒト IgG、ウサギ IgG (いずれも SIGMA 社)、ストレプトアビジン (Dako 社)、オボアルブミン

(Molecular Probes 社) をセレクションバッファーで $10\mu\text{g}/\text{ml}$ にしたもの $200\mu\text{l}$ で懸濁し、氷上で 1 時間反応させた。細胞を遠心により回収し再びセレクションバッファー $200\mu\text{l}$ に懸濁し、これを遠心することで細胞の洗いを行った。染色した細胞の蛍光強度は、EPICS ELITE ESP (Beckman Coulter 社) により測定した。

エライザ：

エライザは、SOLID PHASE GUIDE (Nalge Nunc 社) に準じて行った。Nunc-Immuno Plate MaxiSorp Surface (Nalge Nunc 社) の各ウェルに抗原溶液 (PBS で $5\mu\text{g}/\text{ml}$ にしたもの) $200\mu\text{l}$ を加え、室温で一晩反応させ、抗原によるプレートのコー

トを行った。翌日ウエル中の液を捨て、そこにブロッキング液（0.5%スキムミルクを含むPBS）200 μ lを加え、1時間反応させた。その後ウエルをELISA洗浄液（0.05%Tween 20を含むPBS）200 μ lで3回洗浄した。ここに細胞の培養上清等、抗体を含む溶液100 μ lをくわえ、1時間反応させた。次にELISA洗浄液200 μ lで5回洗浄した。二次抗体は、HRP標識した抗ニワトリIgMヤギ抗体（BETHYL社）をPBSで2000倍に希釈したものを100 200 μ l加え、一時間反応させた。二次抗体後の洗浄はELISA洗浄液200 μ lで5回行った。発色反応は、TMB+（Dako社）100 μ lにより行い、反応の停止は1M硫酸100 μ lにより行った。定量は、 μ Quant Biomolecular Spectrometer（Bio-Tek Instruments社）により、450nmの吸光を測定した。

エライザ用培養上清の作製：

エライザにより力価を解析した培養上清は、血清由来のIgM等を除去するため、以下のようにして調製した培地を用いた。ニワトリ血清（Invitrogen社）から50%飽和硫酸によりイムノグロブリンを沈殿として除去し、上清をPBSに透析した。透析により生じた体積増加をCentri Prep（Amicon社）による濃縮で補正し、抗体除去ニワトリ血清とした。これをAIM-V無血清培地（Invitrogen社）に3%の濃度で加えた。ここに約 10^6 /mlの濃度で細胞を加え、2日培養し、培養上清をとりエライザを行った。

結果：

トリコスタチンA1. 25 ng/mlを含む培地で6週間植え継いだDT40細胞約 5×10^7 個から、ヤギIgGを共有結合させた磁気ビーズによりセレクションを行い、ヤギIgGに結合する細胞の選択を試みた。磁気ビーズに結合した細胞は96穴プレートに分注して培養した。その後生じたコロニーに由来する細胞の抗原結合性を検討した。FITCラベルしたヤギIgGとの結合を、9ク

ローンに関して FACS により解析したところ、うち 1 クローンで、強い蛍光が認められ、この細胞とヤギ IgG との結合が示唆された (図 5 (a))。次に、この結合が特異的であるかどうかを検討するため、FITC ラベルしたストレプトアビジン、およびオボアルブミンで同様の実験を行った。するとストレプトアビジン FITC、オボアルブミン FITC いずれにおいても、蛍光強度の増大は認められず、細胞とヤギ IgG の結合は特異的なものであることが示唆された (図 5 (b))。以上の結果は、トリコスタチン A 処理により多様化した細胞表面の IgM の中で、ヤギ IgG に特異的結合するものが生じ、それが抗原磁気ビーズにより選択されたことを示唆していると考えられる。

次に、ヤギ IgG 以外の抗原に対する抗体を産生する細胞を選別することが可能かどうかを検討するため、ヒト IgG 磁気ビーズを用いてセレクションを行った。ここでは、陽性クロンの候補を得るために、エライザを行った。96 穴プレート中の細胞培養上清 100 μ l により、ヒト IgG でコートしたイムノプレートを用いて解析したところ、14 個のウェル由来の培養上清に関して、著しく強い吸光度がみられた。次にこれらのウェル中の細胞を培養し、ヒト IgG FITC により染色し、FACS で解析した。代表的な例の結果を図 6 (a) に示す。いずれにおいても、低いものでも数倍、高いものでは数百倍の蛍光強度の増加が認められた。また、clone7 clone20 のように単一のピークを示すものも見られたが、clone7 や clone8 のように複数のピーク、あるいはブロードな分布を示すものもみられた。これらの複数のピークやブロードなピークをもつ細胞集団を限外希釈して再度クローン化してやると、明確な単一のピークを示すものが得られた (data not shown)。このことから、clone7 や clone8 のようなパターンを示すものは、96 穴プレートにおいて複数の陽性クローンが同一のウェルに存在していたことを示唆していると考えられる。

次に、clone7、8、20について、抗原特異性を検討した（図6（b））。ヒトIgG FITC、ウサギIgG FITC、ヤギIgG FITC、streptavidin FITC、オボアルブミン FITCで染色し、FACSで解析した。clone7とclone8に関しては、明確なヒトIgGに対する特異性が認められた。一方clone20の場合、ヤギIgGに対しても若干の結合がみられ、異種ホモログに対しても交差することが明らかになった。なお、いずれのクローンもウサギIgG、streptavidin、オボアルブミンに対する結合は認められなかった。

さらに、clone7およびclone20について、培養上清を用いてエリザを行った（図6（c））。ヒトIgG、ウサギIgG、ヤギIgG、streptavidin、オボアルブミンでコートした免疫プレートを用いたところ、clone7、clone8いずれにおいてもヒトIgGに対して反応性を示し、clone7では50倍希釈、clone20では500倍希釈まで、有意なシグナルが検出された。また、clone20はFACS解析でヤギIgGとの若干の反応性が認められたが（図6（b））、ELISAにおいても、弱いながら、ヤギIgGとの反応が見られ、FACS解析と一致した結果となった。なお、セレクションをかけていない細胞の培養上清はどの抗原に対しても特に反応は示さなかった。

産業上の利用可能性

本発明に係る体細胞相同組換えの促進方法によれば、所望の体細胞相同組換えを制御された状況下で誘起促進させることができ、よって、例えばタンパク質因子の創製に利用することが可能になる。

また、本発明に係る抗体作製方法によれば、培養細胞を用いて人工的に多様な抗体を作製することができる。

さらにまた、特定の疾病の治療に有効な抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体等）を生産するために作成された免疫細胞株（US Pat

nt A1 20020028488) を用いることで、より治療効果を発揮する多様な抗体を、培養細胞系の利用により簡便かつ継続的に確保することができる。

請 求 の 範 囲

1. 遺伝子座においてDNA相同組換えが起きている体細胞の相同組換えを、該体細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させることによって促進することを特徴とする、体細胞相同組換えの促進方法。

2. 抗体遺伝子座においてDNA相同組換えが起きている免疫細胞から抗体を作製するに当たり、該免疫細胞の染色体におけるクロマチン構造を弛緩させることによって、抗体遺伝子座におけるDNA相同組換えを促進させ、それによって多様な抗体を獲得することを特徴とする抗体作製方法。

3. 染色体のクロマチン構造の弛緩を、細胞をヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤と接触させて処理することにより誘導することを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

4. 阻害剤がトリコスタチンAであることを特徴とする請求項3に記載の方法。

5. トリコスタチンAの処理濃度が約 0.5 ng/ml から約 5.0 ng/ml であり、接触処理時間が約2週間から約6週間であることを特徴とする請求項4に記載の方法。

6. 細胞がDT40培養細胞であることを特徴とする請求項1ないし5に記載の方法。

7. 請求項1、3、4、5又は6のいずれか1項に記載の方法により遺伝子座における体細胞相同組換えが促進された免疫細胞。

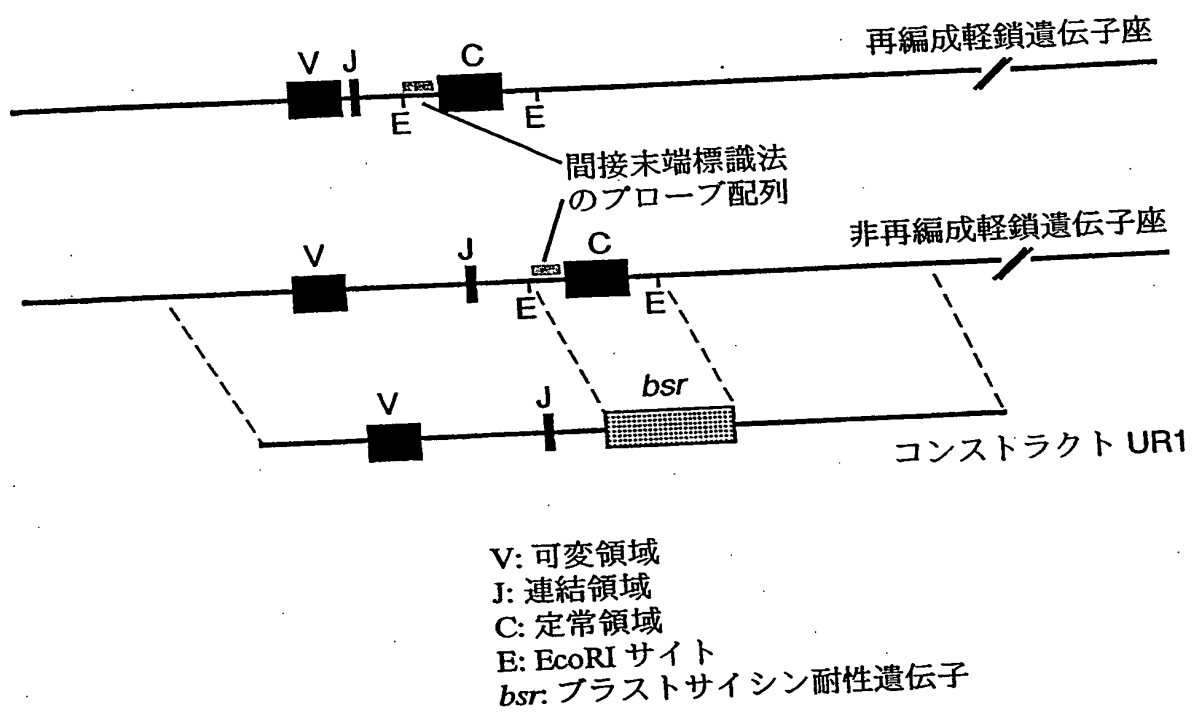
8. 請求項 2 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法により作製された多様な抗体。

9. 作製された抗体が I g M である請求項 8 に記載の抗体。

10. 遺伝子座における体細胞相同組換えを促進するための薬剤であって、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤からなる薬剤。

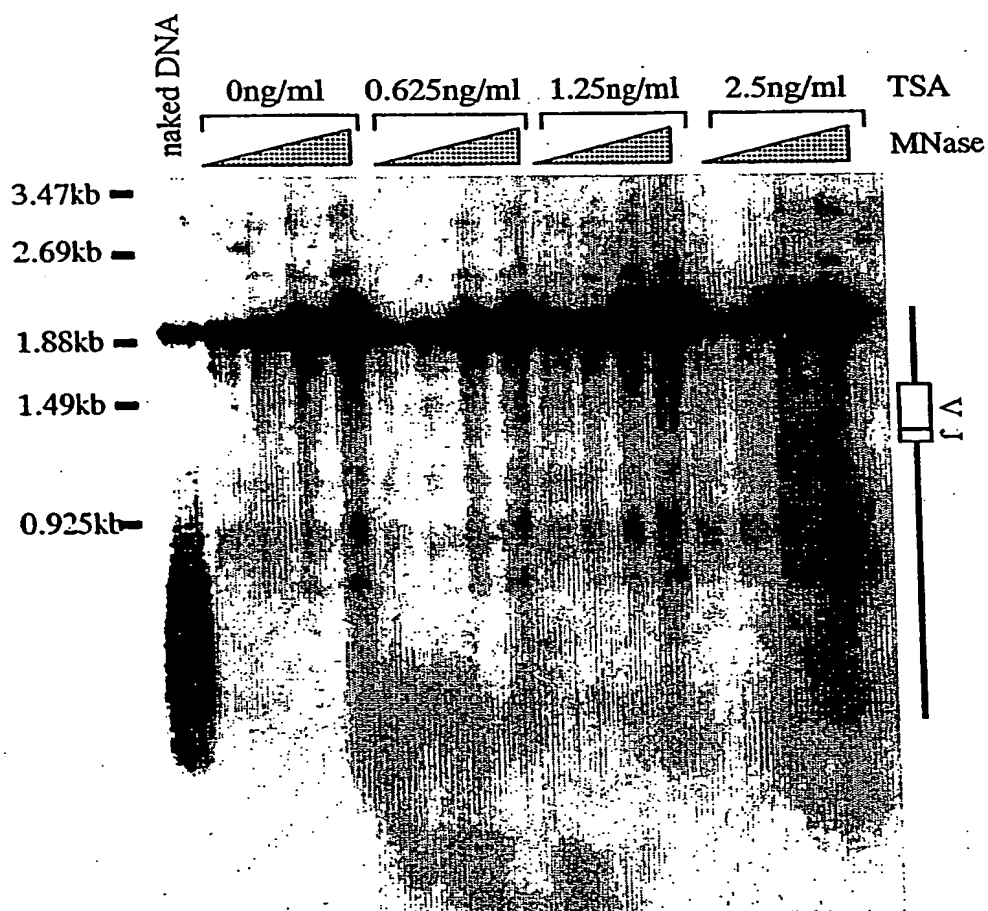
11. 阻害剤がトリコスタチン A である請求項 10 に記載の薬剤。

図 1



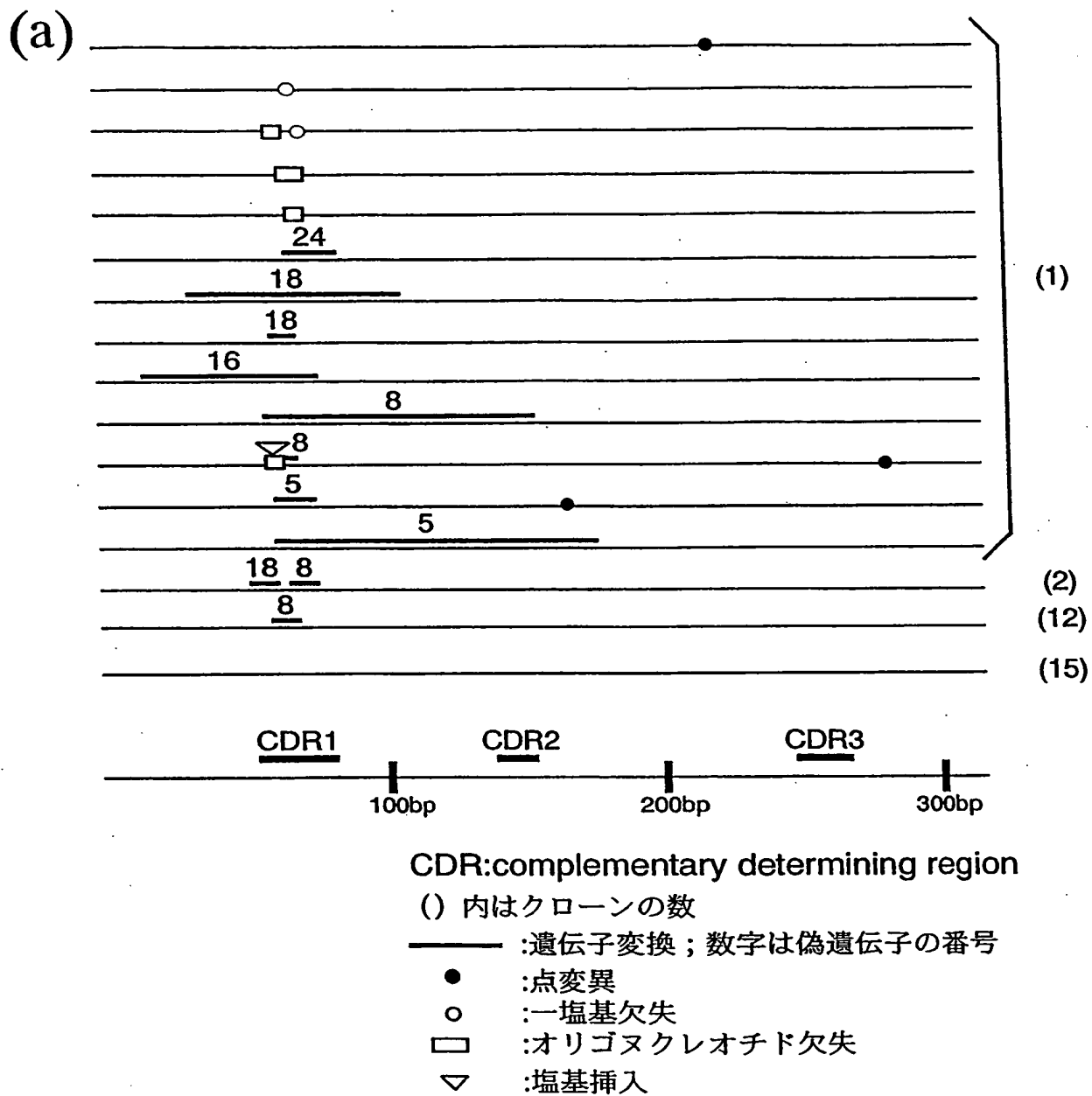
2/8

図 2

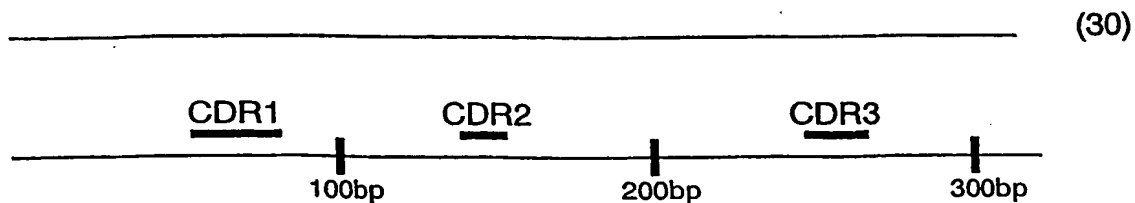


BEST AVAILABLE COPY

図 3



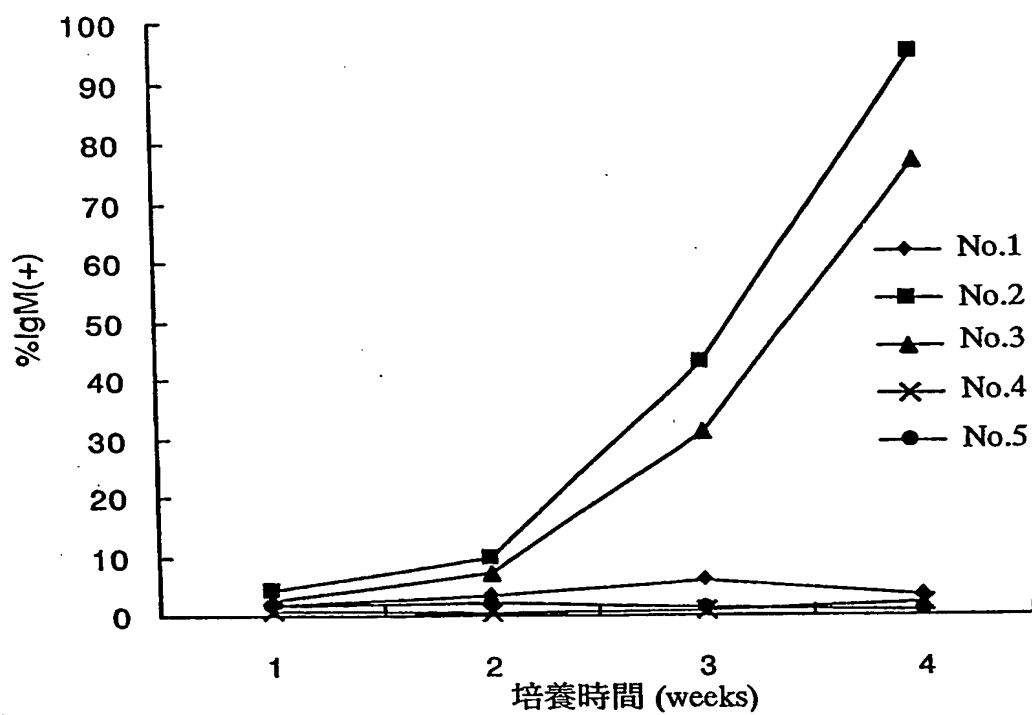
(b)



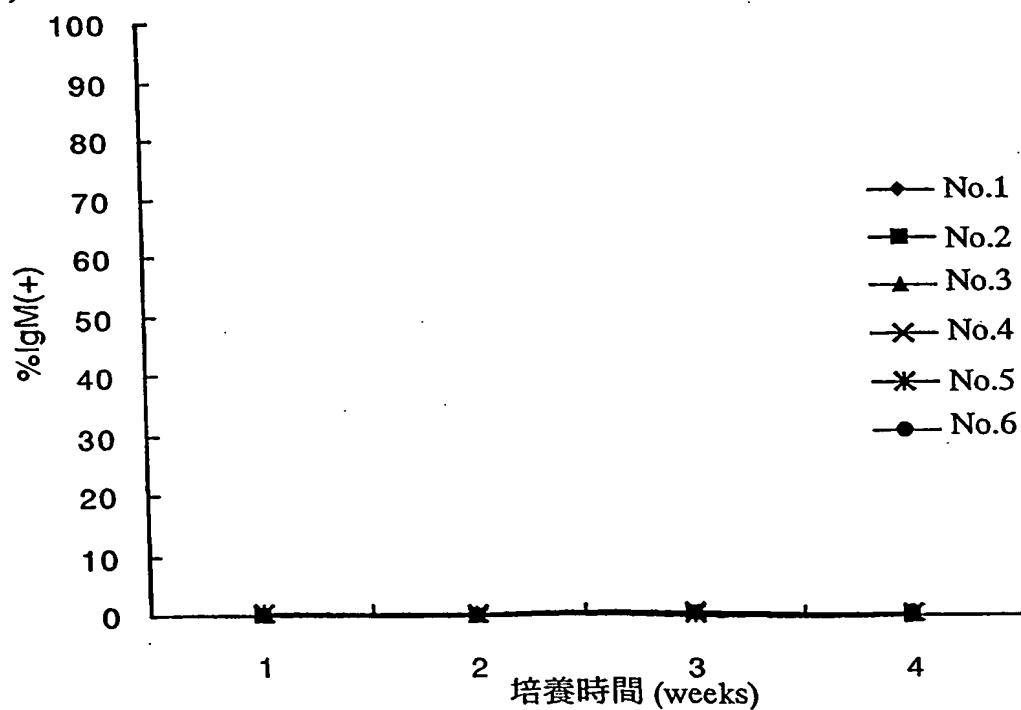
4/8

図 4

(a)



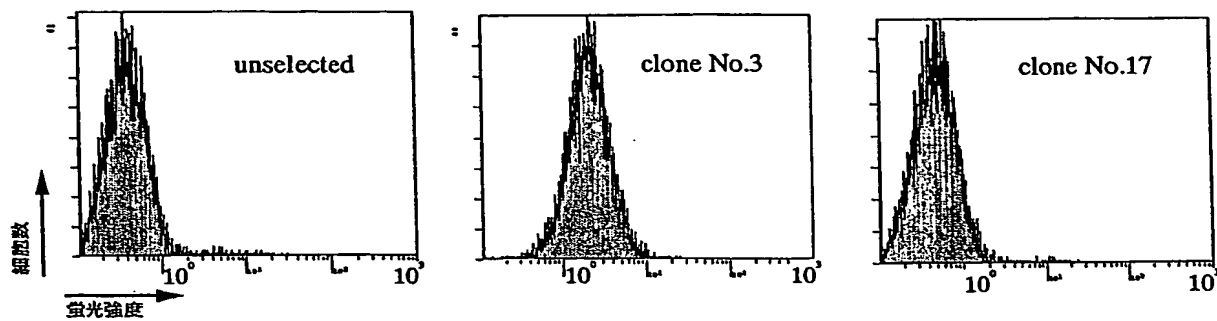
(b)



5/8

図 5

(a)



(b)

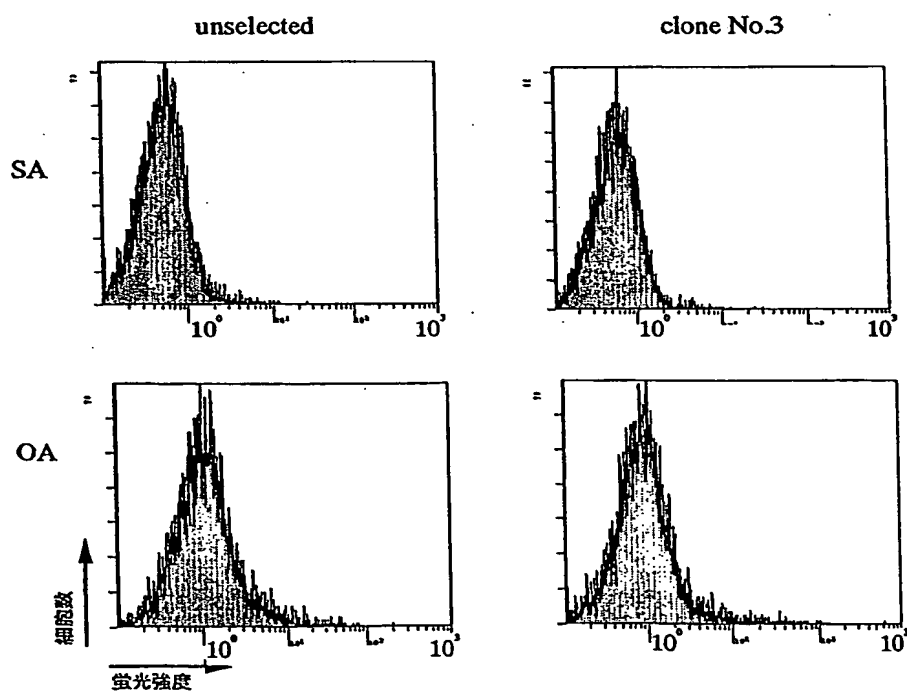


図 6 (a)

(a)

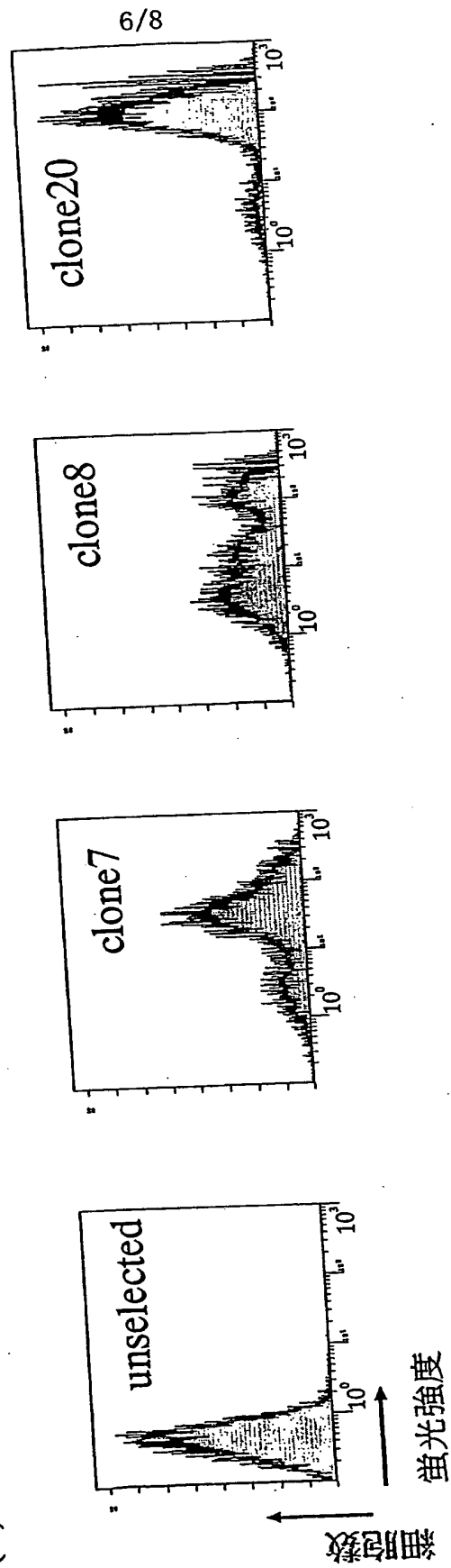
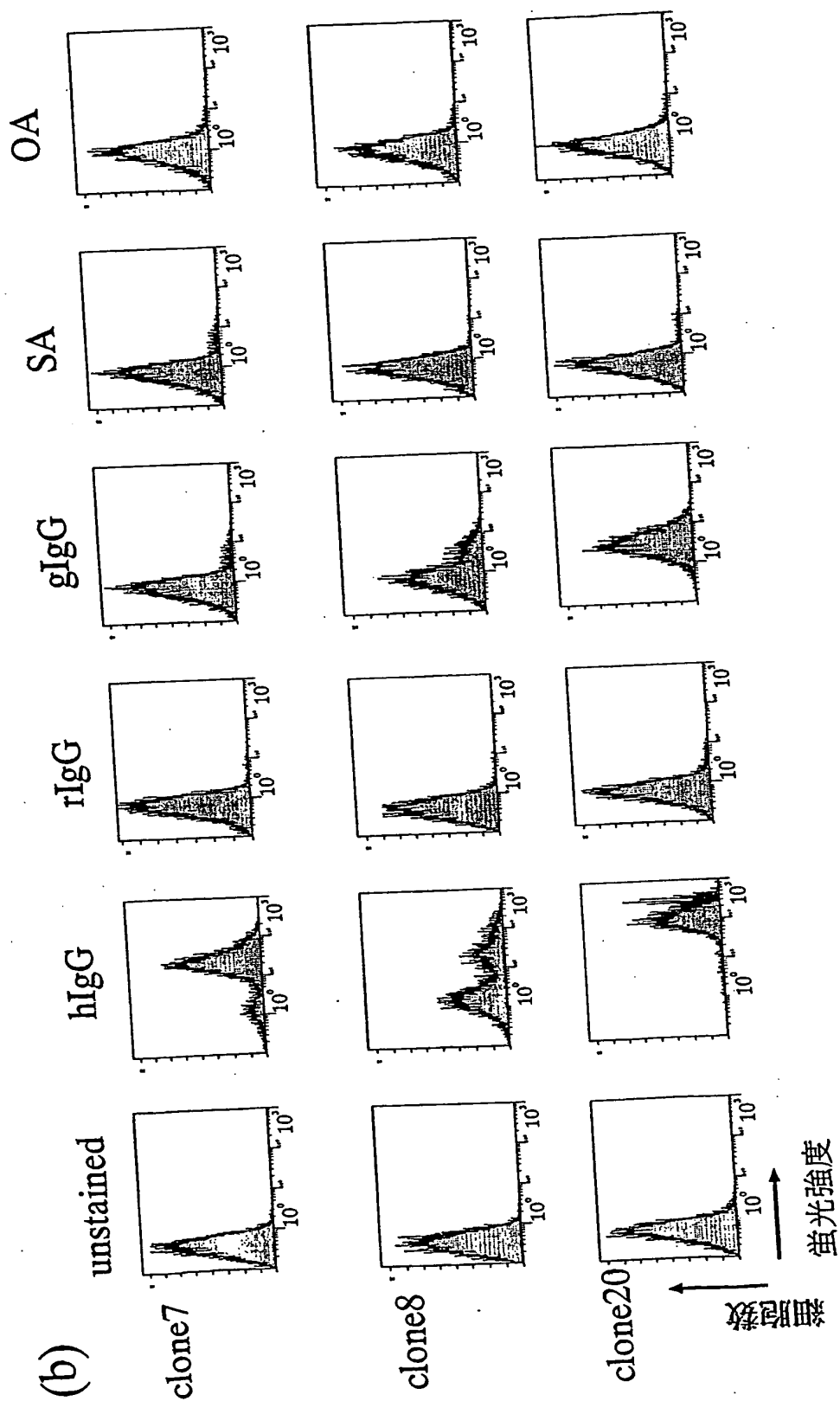


図 6 (b)

(b)





1/2

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

Japan Science and Technology Corporation, JST

<120> In vitro generation of specific antibody by enhanced homologous recombination

<130> PC4009RIK

<150> JP2002-221232

<151> 2002-07-30

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed nucleotides for PCR amplification

<400> 1

atcttgccctt cctcatggc

19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed nucleotide for PCR amplification

2/2

<400> 2

gtttgggtga acgtggttc

19

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 3

cacacctcag glactcgttg cg

22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 4

tcagcgactc acctaggacg g

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/09563

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/00, C12N5/06, C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/00, C12N5/06, C07K16/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	BUERSTEDDE, JM. et al., Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line, EMBO. J., 1990, Vol.9, No.3, pages 921 to 927	8-9/1-7, 10-11
X/Y	SALE, J.E. et al., Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation, Nature, 2001, Vol.412, No.6850, pages 921 to 926	8-9/1-7, 10-11
Y	AGATA, Y. et al., Histone acetylation determines the developmentally regulated accessibility for T cell receptor gamma gene recombination, J.Exp. Med., 2001, Vol.193, No.7, pages 873 to 880	1-7, 10-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 August, 2003 (28.08.03)

Date of mailing of the international search report
09 September, 2003 (09.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09563

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X/ P, Y	CUMBERS, S.J. et al., Generation and iterative affinity maturation of antibodies in vitro using hypermutating B-cell lines, Nat.Biotechnol., 2002 November, Vol.20, No.11, pages 1129 to 1134	8-9/ 1-7, 10-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/09, C12P21/00, C12N5/06, C07K16/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/09, C12P21/00, C12N5/06, C07K16/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	BUERSTEDDE, JM. et al., Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line, EMBO J, 1990, Vol. 9, No. 3, pp. 921-927	8-9 /1-7, 10-11
X/Y	SALE, J.E. et al., Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation, Nature, 2001, Vol. 412, No. 6850, pp. 921-926	8-9 /1-7, 10-11

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.08.03

国際調査報告の発送日

09.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

七條 里美

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	AGATA, Y. et al., Histone acetylation determines the developmentally regulated accessibility for T cell receptor gamma gene recombination, J Exp Med, 2001, Vol.193, No.7, pp. 873-880	1-7, 10-11
PX/PY	CUMBERS, S. J. et al., Generation and iterative affinity maturation of antibodies in vitro using hypermutating B-cell lines, Nat Biotechnol, 2002 Nov, Vol.20, No.11, pp. 1129-1134	8-9 /1-7, 10-11